

烏骨鶏選抜集団におけるプロラクチン遺伝子プロモーター領域の 24-bp の挿入と生産形質との関連性

和田康彦¹・中牟田裕子¹・岳 佳妮¹・松田莉朋¹・阿部正八郎²・阿南加治男²

¹ 佐賀大学農学部, 佐賀県佐賀市本庄町 840-8502

² 大分県農林水産研究センター畜産試験場中小家畜・環境担当, 大分県豊後大野市三重町 879-7111

烏骨鶏は古来より薬用鶏として珍重されているが、就巢性が強く、そのため産卵率が低く生産効率が非常に悪い。プロラクチン遺伝子は就巢性の開始や持続に必須の遺伝子であると考えられているが、この遺伝子のプロモーター領域に烏骨鶏と比較して白色レグホーンで 24-bp の挿入があり、この挿入配列の有無と就巢性との関連性が疑われている。そこで、このプロラクチン遺伝子プロモーター領域の 24-bp の挿入の有無について、烏骨鶏の選抜集団第 4 世代について遺伝子型判定を行い、産卵率などの生産形質との関連性を検討した。大分県畜産試験場において産卵率について選抜された烏骨鶏選抜集団の第 4 世代の雄 69 羽、雌 242 羽を材料とした。これらの個体の全血から DNA を抽出し、PCR によりプロラクチンのプロモーター領域を増幅し、3% アガロースゲル電気泳動で 24-bp の挿入の有無を断片長によって判定した。遺伝子型判定の結果は Del/Del 型 282 羽、In/Del 型 29 羽で In/In 型の個体は 1 羽も存在しなかった。また、産卵率などの生産形質について、この遺伝子型を主効果とする分散分析を実施し、遺伝子型と生産形質との関連性を検討した。分散分析の結果、プロラクチン遺伝子プロモーター領域の 24-bp の挿入の有無は、雄の 150 日齢体重、450 日齢体重、雌の 150 日齢体重、450 日齢体重、151-450 日齢での産卵率などの生産形質との間に有意な関連性は認められなかった。Del/Del 型の個体と In/Del 型の個体で 151-450 日齢での産卵率の羽数分布を調べたところ、Del/Del 型の個体の分布と In/Del 型の個体の分布は重なり合っていたが、Del/Del 型のピークは 50-55% であったのに対して In/Del 型のピークは 60-65% であり、In/Del 型のピークの方が 10% 程度高い産卵率を示した。

キーワード: 烏骨鶏, プロラクチン, プロモーター領域, 産卵率, 就巢性

緒 言

烏骨鶏の肉や卵は、古来より疲労回復、虚弱体質改善、慢性胃炎、婦人病、神経痛、糖尿病、高血圧、リュウマチ等の疾患への効用や健康増進に効果があると考えられており、中国では薬用鶏として珍重され、漢方薬の原料としても記載されていた。烏骨鶏は白色レグホーンなど他の品種の鶏卵に比べ、全卵に対する卵黄の比率や烏骨鶏卵に含まれるビタミン B2, B6, D, E およびカルシウムとカリウムといった無機質の含有量が多く、全脂肪酸に対するアラキドン酸、ドコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸を含む不飽和脂肪酸の割合も、他の品種の鶏卵と比べて高いが、コレステロール含量は少なくなっている(長谷川ら, 1990, Koketsu and Toyosaki, 2004)。しかし、いまだに薬効の原因物質ははっきりとしていない。

近年の健康志向や自然食品のブームで、烏骨鶏卵は健康食品として高価に取引されているが、他の卵用鶏種が年間約 300 個以上

産卵するのに対し、烏骨鶏は年間 50-200 個程度しか産卵しないため、生産効率が極めて低い(秋篠宮ら 1994, 全国日本鶏保存会 2004)。烏骨鶏の産卵率が低いのは、烏骨鶏の就巢性が強いからだと考えられており、遺伝的な改良の必要性がある。近年、東京都、栃木県、和歌山県などで烏骨鶏の産卵率を改良しようとする選抜試験が実施されているが、ある程度の改良はできるものの産卵率は 50% 程度で頭打ちになっている。また、選抜によって烏骨鶏の薬用鶏としての特性が失われてしまう可能性も否定できない。

家禽の抱卵行動の開始はプロラクチン分泌の増加によって誘導され、このことが原因で卵巣の退行と卵生産の低下が起こる(Ishida *et al.*, 1991)。また、雌鶏の血漿プロラクチン濃度は、抱卵中高い値で維持されるが孵化とともに減少し、昼は低いが夜にはある程度上昇するリズムを示す。これは雌鶏が夜には雛を翼の下に集めて温めることと関係があると考えられている(Sharp *et al.*, 1988)。

Jiang *et al.* (2005) はプロラクチン遺伝子のプロモーター領域について、烏骨鶏や白色レグホーン、中国在来鶏などの塩基配列の多型性を検討した結果、プロラクチンのプロモーター領域-377~-354 (Genbank accession no. AB011434) では烏骨鶏や他の中国在来鶏に対して白色レグホーンにおいて 24-bp の挿入が存在することを報告している。彼らは品種ごとに、この 24-bp の挿入の有無について遺伝子型頻度を算出し、烏骨鶏のように就巢性の

2008 年 5 月 12 日受付, 2008 年 6 月 24 日受理

連絡者: 和田康彦

〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1 番地

Tel: 0952-28-8787

Fax: 0952-28-8787

E-mail: ywada@cc.saga-u.ac.jp

強い品種では In/In 型の個体がほとんど存在しないことから、この 24-bp の挿入の有無が就巢性と関連があるのではないかと考察している。

和田ら (2008) は日本における 53 羽の烏骨鶏について上記の挿入の有無についてタイピングを行ったところ、やはり In/In 型の個体は 1 羽も存在していなかった。また、遺伝子頻度から予想される烏骨鶏と他の品種の遺伝子型別の期待数と実測数を比較するために、2×3 のカイ自乗検定を行ったところ、この遺伝子座においては、烏骨鶏と他の鶏品種で遺伝子型頻度において有意な差異があることを明らかにした。

Cui *et al.* (2006) は烏骨鶏と白色レグホーンを含む 117 羽について、プロラクチンのプロモーター領域における上記の挿入の有無と他の 6 つの 1 塩基置換についてのタイピングを行い、烏骨鶏と白色レグホーンで大きく遺伝子頻度が異なることを明らかにした。さらに、ノンダーエ (Nongdahe) と烏骨鶏の F2 世代 374 羽について、これらの遺伝子型と産卵数との関連を調べた結果、この遺伝子座は 1% 水準で産卵数に有意な効果を持っていることを示した。

大分県農林水産研究センター畜産試験場では平成 12 年度から宮崎、青森、東京、佐賀、大分の各都県畜産試験場等から導入した烏骨鶏から基礎集団を作成し、産卵率を指標とした選抜を行っている。そこで、本研究では上記のプロラクチン遺伝子プロモーター領域の 24-bp の挿入の有無が烏骨鶏の産卵率向上の DNA マーカーとして使用可能かを検証するために、この新大分系烏骨鶏の選抜第 4 世代について、遺伝子型判定を行い、産卵率などの生産形質との関連性について検討した。

材料と方法

宮崎、青森、東京、佐賀、大分の各都県畜産試験場等から導入した白色烏骨鶏から基礎集団を作成した。選抜の各世代において、雌は 280 日齢までケージでの個体検定を実施し、産卵率の優れた個体を選抜し、体型の優れた雄と交配した。本研究では、選抜第 4 世代の雌 242 羽、雄 69 羽を材料として使用した。生産形質として 151-450 日齢での産卵率、294-300 日齢での卵重と卵殻強度、450 日齢での体重を測定した。なお、平均卵重と平均卵殻強度については約半数の 112 羽についてのみ調査した。

成鶏においてヘパリン入り採血管を用いて全血を採血し、塩析法により DNA を抽出した。DNA 抽出は Pure Gene キット (フナコシ株式会社、東京) を使用しメーカー指定のプロトコールにより行った。各個体の DNA をテンプレートとしてプロラクチン遺伝子のプロモーター領域における PCR を実施し、PCR 産物を 3% アガロースゲル電気泳動により分離し、その断片長より遺伝子型を判定した。ここで、24 bp の挿入がないものは 130 bp であり、挿入があるものが 154 bp である (図 1)。PCR に使用したプライマーは PRLpro2F (GGTGGGTGAAGAGACAAGGA) と PRLpro2R (TGCTGAGTATGGCTGGATGT) であり、PCR 酵素には Takara ExTaq Hot start version (タカラバイオ株式会社、大津) を使用した。PCR 条件は 95 分で 5 分間熱変性を行い、95°C 30 秒間の熱変性、60°C 30 秒間のアニーリング、72°C 1 分間の伸長反応を 40 サイクル行った後、72°C 10 分間の伸長反応を

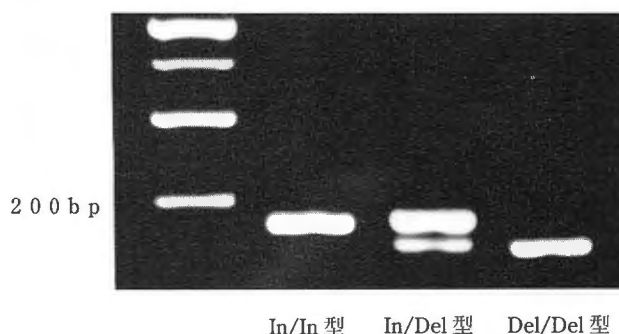


図 1. 3% アガロース電気泳動による遺伝子型判定
左から 100 bp ラダーマーカー、In/In 型 (154 bp, 白色レグホーン)、In/Del 型 (烏骨鶏)、In/In 型 (130 bp, 烏骨鶏)。

行った。

予備分析の結果、すべての生産形質について鶏舎などの他の環境要因の効果が認められなかったため、24-bp の有無の遺伝子型と父親、母親および父と母の交互作用を変動因とした最小自乗分散分析を実施し、産卵率などの生産形質との関連性について検討した。

結 果

烏骨鶏選抜集団の世代別の成績を表 1 に示した。151-450 日齢の産卵率は基礎鶏の 40.5% から選抜により 10% 程度改善されたが、選抜圧をかけていない平均卵重と平均卵殻強度については改良の効果は認められなかった。450 日齢体重については雌では改良の効果はほとんど認められなかったものの、雄では 75 g の増加が認められた。第 3 世代から第 4 世代における 151-450 日齢の産卵率の実現遺伝率は 0.2157 であった。

遺伝子型判定の結果は、Del/Del 型 282 羽、In/Del 型 29 羽で、In/In 型は 1 羽も存在していなかった。Del の遺伝子頻度は 0.95 で、In の遺伝子頻度は 0.05 と非常に小さい値であり、遺伝子型頻度の実測値とハーディーワインベルグ平衡時の遺伝子頻度の理論値の間に有意な差は認められなかった。

最小自乗分散分析を用いて、産卵率などの生産形質と 24-bp の挿入の有無の遺伝子型との関連性を検討したが、全ての形質で遺伝子型の効果、父の効果、父と母の交互作用効果について有意性は認められなかった。母の効果については、151-450 日齢の産卵率についてのみ 5% 水準で有意性が認められた (表 2)。

遺伝子型別の 151-450 日齢の産卵率の羽数分布を図 2 に示した。Del/Del 型の個体の分布と In/Del 型の個体の分布は重なり合っていたが、Del/Del 型のピークは 50-55% であったのに対して In/Del 型のピークは 60-65% であり、In/Del 型のピークの方が 10% 程度高い産卵率を示した。

考 察

烏骨鶏は産卵率に大きな影響を与える就巢性が強いが、赤色野鶏のほか、プリマスロックやロードアイランドレッドなどのプロライナー品種においても就巢性が認められる。これら就巢性を持つ

表 1. 烏骨鶏選抜集団の世代別の成績

世代	産卵率 (151-450 日齢) (%)	平均卵重 (294-300 日齢) (g)	平均卵殻強度 (294-300 日齢) (kg/cm ²)	450 日齢体重 (g)	
				雄	雌
基礎鶏	40.5	39.7	3.52	1638	1227
基礎集団	40.4	39.6	3.59	1635	1190
第 1 世代	54.0	41.0	3.97	1696	1212
第 2 世代	48.8	40.2	3.99	1679	1251
第 3 世代	48.2	39.3	3.77	1711	1310
第 4 世代	51.5	39.0	3.73	1710	1217

表 2. 第 4 世代での分散分析結果

	産卵率 (151-450 日齢)	平均卵重 (294-300 日齢)	平均卵殻強度 (294-300 日齢) (kg/cm ²)	450 日齢体重	
				雄	雌
父	1.80 [†]	2.36	0.07	2.39	0.13
母	5.88*	0.32	1.41	0.06	2.24
父×母	0.25	3.22	0.14	3.99	0.10
遺伝子型	1.74	0.04	0.04	0.75	0.02

[†]; 数値は F 値, *; P<0.05.

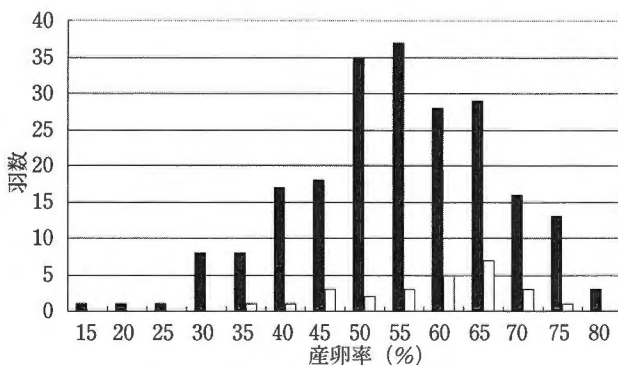


図 2. 遺伝子型別の産卵率の度数分布
白棒グラフ; In/Del 型, 黒棒グラフ; Del/Del 型.

品種とレグホーンのような就巢性を持たない品種との交雑を行うと就巢性を持つことから、就巢性が優性形質であることは古くから知られていた。また、Saeki and Inoue (1979) は赤色野鶏と白色レグホーンとの正逆交雑により、就巢性の遺伝子が Z 染色体に座していることを示した。Zadworny *et al.* (1999) はプロラクチン遺伝子のプロモーター内に 6 カ所の PCR-SSCP マーカーを設定し、3 カ所のマーカーで就巢性のある品種と就巢性のない品種の間にアレル頻度に大きな差があることを報告している。一方、Kansaku *et al.* (2008) はその総説の中で、プロラクチン遺伝子のアミノ酸配列は、ニワトリと他の鳥類の間に大きな相違がないことを報告している。

本研究において、プロラクチン遺伝子のプロモーター領域の 24-bp の挿入の有無について、大分県畜産試験場の烏骨鶏選抜集団第 4 世代の 311 羽について遺伝子型判定を行った結果、Jiang *et al.* (2005) や和田ら (2008) と同様に In/In 型の個体は 1 羽も存在していなかった。烏骨鶏は、明代にはすでに漢方書に記載されていることから、品種成立から 300 年以上が経過していると考えられ、現在までの間、完全な閉鎖集団として維持されてきたとは考えにくい。それにもかかわらず、日本の烏骨鶏も中国の烏骨鶏もともに In/In 型が 1 羽も存在しなかったことは、この 24-bp の挿入部位の近傍に品種特異的な表現型に関する責任遺伝子が存在し、それと Del とが強く連鎖している可能性があると思われる。

Cui *et al.* (2006) はノンダーエ (Nongdahe) と烏骨鶏の F2 374 羽について、24-bp の挿入の有無と産卵数との関連を調べた結果、この遺伝子型は 1% 水準で産卵数に有意な効果を持っていることを示している。本研究では 24-bp の挿入の有無と産卵率の間に有意な関連性は認められなかったが、Del/Del 個体と In/Del 個体の産卵率の度数分布のピーク位置が異なっていたことから、この 24-bp の挿入の有無は産卵率に対して何らかの効果を持っているのかもしれない。また、本研究で材料に用いたのは産卵率で選抜している選抜集団の第 4 世代であり、In アレルの遺伝子頻度が極めて小さいことから、明確な差異が認められなかったのかもしれない。

本研究で用いた烏骨鶏選抜集団の第 3 世代から第 4 世代における 151-450 日齢の産卵率の実現遺伝率は 0.2157 であり、最小自乗分散分析において、産卵率に対する母の効果は認められたことか

ら、この集団において産卵率に遺伝変異が残っていることは明らかである。したがって、今回調査したプロラクチン遺伝子のプロモーター領域の24-bpの挿入以外にも、産卵率に効果を及ぼす遺伝子変異が存在するものと考えられる。Cui *et al.* (2006)はプロラクチン遺伝子上流の-2000から-2400付近で6個の1塩基置換を発見し、それらと産卵数などとの関連について検討したが、プロモーター領域の24-bpの挿入のように有意な効果を持つSNPは存在しなかったと報告している。これらより、鳥骨鶏の産卵率を改良するためには、Z染色体上に座乗しているプロラクチン受容体遺伝子などのプロラクチン遺伝子とは異なる遺伝子についても検討する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金 (No. 18580291) の助成を受けた。

引用文献

- 秋篠宮文仁・柿澤亮三・マイケル ロバーツ・ビクトリア ロバーツ. 欧州家禽図鑑. 第1版. 40-41頁. 平凡社. 東京. 1994.
- Cui JX, Du HL, Liang Y, Deng XM, Li N and Zhang XQ. Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production. *Poultry Science*, 85 : 26-31. 2006.
- 長谷川恭子・村松輝江・太田順子. 鳥骨鶏卵のコレステロール含有量および脂肪酸組織. *女子栄養大学紀要*, 21 : 147-150. 1990.
- Ishida H, Shimada K, Sato K, Seo H, Murata Y, Matsui N, and Zadworny D. Developmental expression of the prolactin gene in the chicken. *General and Comparative Endocrinology*, 83 : 463-467. 1991.
- Jiang RS, Xu GY, Zhang XQ and Yang N. Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens. *Poultry Science*, 84 : 839-845. 2005.
- Kansaku N, Hiyama G, Sasanami T and Zadworny D. Prolactin and growth hormone in bird : protein structure, gene structure, and genetic variation. *Journal of Poultry Science*, 45 : 1-6. 2008.
- Koketsu M and Toyosaki T. Nutritive constituents of Silky fowl eggs : comparison with hen eggs of White Leghorn origin. *Animal Science Journal*, 75 : 67-69. 2004.
- Saeki Y and Inoue Y. Body growth, egg production, broodiness, age at first egg and egg size in Red Jungle Fowls, and an attempt at their genetic analyses by the reciprocal crossing with White Leghorns. *Japan Poultry Science*, 15 : 121-126. 1979.
- Sharp PJ, Macnamee MC, Sterling RJ, Lea RW and Pedersen HC. Relationships between prolactin, LH and broody behaviour in bantam hens. *Journal of Endocrinology*, 118 : 279-286. 1988.
- 和田康彦・戸谷温子・岳 佳妮・ローシャン・ジャーハン. 鳥骨鶏と他の鶏品種におけるプロラクチン遺伝子のプロモーター領域における24-bp挿入の比較. *西日本畜産学会報*, 51 : 39-42. 2008.
- Zadworny D, Kansaku N, Bedecarrats G, Guemene D and Kuhnlein U. Prolactin and its receptor in galliforms. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 13 : 223-229. 1999.
- 全国日本鶏保存会 監修. カラー版日本鶏外国鶏. 第2版. 63-65頁. 家の光協会. 東京. 2005.

Relationship between 24-bp Insertion of Prolactin Promoter Region and Performance Traits in the Selected Population of Silkie Chicken

Yasuhiko Wada¹, Yuko Nakamuta¹, Yue Jiang¹, Riho Matsuda¹,
Syohatiro Abe² and Kajio Anan²

¹ Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840-8502

² Smaller Livestock and Environment Section, Livestock Research Institute, Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, Mie town, Bungo-ohno, Oita 879-7111

Silkie chicken (*Gallus gallus*) have played an important role in traditional Chinese Medicine, however broodiness is often observed and egg production ratio is very small in Silkie chicken. It is thought that prolactin gene is an essential for the start and maintain of broodiness in hens. The 24-bp insertion is found in the promoter region of prolactin gene of White Leghorn as compare with Red Jungle fowl and the absence of the 24-bp insertion would maintain normal function of the prolactin promoter. In this study, the 24-bp insertion was genotyped in the fourth generation of the Silkie population selected for egg production and the relationship between the genotype of the insertion locus and performance traits was investigated. Blood samples of 69 male Silkies and 242 female Silkies were collected from the fourth generation of Silkie population selected for egg production in Livestock Research Institute of Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center. Genomic DNA was isolated from blood samples and the fragment of the promoter of prolactin gene was amplified using PCR. The PCR products were electrophoresed on 3.0% agarose gels for genotyping. The 282 Del/Del Silkies, 29 In/Del Silkies and no In/In Silkie were found in this study. The relationship between the genotype of the insertion locus and the performance traits was analyzed by analysis of variance, however there was no relationship for growth traits and egg production. The In/Del Silkies have higher peak of the distribution of 151 d-450 d egg production ratio than the De/Del Silkies.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 45 : J82-J86, 2008)

Key words : broodiness, egg production, prolactin, promoter, Silkie chicken